

研究简报

微囊藻毒素 LR 诱导大鼠肾 NRK 细胞 Bax 蛋白表达

陈加平 徐立红 傅文字 邢鸣鸾

(浙江大学医学院, 杭州 310031)

BAX EXPRESSION OF RAT NEPHROCYTE NRK INDUCED BY MICROCYSTIN LR

CHEN Jia Ping, XU Li Hong, FU Wen Yu and XING Ming Luan

(Medical School, Zhejiang University, Hangzhou 310031)

关键词: 细胞凋亡; 藻毒素; Bax

Key words: Apoptosis; Microcystin; Bax

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 1009-3207(2004)04-0452-02

近年来水体富营养化已成为一个全球性关注的问题, 过量的氮、磷使藻类过度生长并产生水华。微囊藻毒素是蓝藻的一些属产生的次生代谢产物, 在发生水华的水体中这类毒素普遍存在。微囊藻毒素产生的原因和作用目前还不是很清楚, 然而它们对动物和人类都能产生极为严重的影响。

细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育, 维护内环境稳定, 由基因控制的细胞主动死亡过程。细胞凋亡是多细胞生物生命活动过程中不可缺少的组成内容, 贯穿于全部生命周期中。细胞凋亡受到高度精密的调控, 并且受多种因子诱导, 异常的上调/ 下调都会导致生物体平衡的破坏, 如果细胞凋亡发生功能障碍或失去控制将导致多种疾病的发生。

许多研究表明微囊藻毒素可引起多种细胞发生凋亡, 动物体内实验表明细胞凋亡在微囊藻毒素诱导的大鼠肝损伤中起了很大作用。一般认为微囊藻毒素作用的靶器官是肝脏, 因此大多数的研究都集中在肝脏, 但有实验表明, 肾脏也是微囊藻毒素作用的靶器官^[1]。因此本文将着重于探讨在微囊藻毒素 LR 诱导的大鼠肾细胞凋亡中 Bax 表达的变化, 这对进一步阐明微囊藻毒素的毒性作用机理将会有很重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料 正常大鼠肾细胞 NRK 细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。

1.2 试剂 RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, 胰蛋白酶购自 Serva 公

司, Bax 一抗(羊抗大鼠多克隆抗体), 二抗(HRP 标记的驴抗羊 IgG), 以及 ECL 化学发光试剂盒购自 Santa Cruz 公司, 硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司。电泳装置为 BioRad Mini-PROTEAN 3 cell。微囊藻毒素 LR 由日本名城大学 Harada 教授赠送。

1.3 细胞培养及处理 NRK 细胞以含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37℃ 及 5% CO₂ 的湿化培养箱中进行培养, 隔天传代一次。实验所用的细胞均处于对数生长期。根据实验要求, 细胞按 5×10^5 cell/mL 的密度接种于六孔板上, 在培养体系中在实验开始 0、4、6 和 7h 分别加入 LR 至终浓度为 0、10、100 和 1000nmol/L, 每孔只加一次, 最后在 8h 时将细胞消化下来进行实验

1.4 western blot 检测 Bax 表达 样品经 LR 处理的 NRK 细胞用冷 PBS 缓冲液洗后重悬于 100μL 细胞裂解液 (50mmol/L Tris Cl, 150mmol/L NaCl, 15mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, pH 8.0) 中, 4℃ 放置 1h 后, 离心 (10000g, 4℃) 10min, 取上清, Folin 酚法测蛋白浓度, 分装, -80℃ 保存备用。

蛋白电泳及转移根据文献方法^[2] 略加修改。将每个样品的蛋白浓度调整到相同后加入等体积 2×SDS 电泳加样缓冲液, 混匀后置入沸水中加热 5min, 以使蛋白变性, 即为可电泳的样品。每孔加 50μg 的蛋白样品电泳, 积层胶电压 50V, 分离胶电压 90V。电泳结束后转膜 2h, 接着将转移上蛋白的硝酸纤维素膜用 TBS 缓冲液 (50mmol/L Tris Cl, 150mmol/L NaCl, pH 7.6) 短暂漂洗后加入封闭液中温和振荡 1h。然后将膜放入 1:500 稀释的 Bax 一抗中, 温和振荡 40min 后置 4℃ 冰

收稿日期: 2003-09-01; 修订日期: 2003-11-17

基金项目: 国家自然科学基金 (20137010); 863 项目 (2001AA641030); 教育部博士点基金 (20020335078) 资助

作者简介: 陈加平 (1973—), 男, 湖北仙桃人; 博士生; 主要从事环境毒理学工作

通讯作者: 徐立红, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

箱中过夜。去掉一抗后用TBST(50mmol/L Tris Cl, 150mmol/L NaCl, 0.1% TWEEN-20, pH7.6)洗膜30min, 将膜置于1:1000稀释的二抗中温和振荡1h, 然后用TBST洗膜2h, 期间每30min换一次TBST。曝光、显影及定影, 在暗室, 取ECL试剂A和试剂B各2mL, 混合后覆盖膜上, 1min后弃去化学发光试剂, 将膜放入暗盒内, 用X光胶片进行曝光、显影及定影。

1.5 结果分析 Kodak凝胶图像分析系统对X光胶片上的条带进行灰度扫描分析。考虑到各次实验结果的可比性, 结果用实验样品与对照样品灰度扫描的比值表示, 实验重复3次, 以平均值±标准差表示, 并用SPSS10.0统计软件做差异显著性分析。

2 结果与讨论

肾细胞NRK暴露于不同浓度LR后Bax蛋白印迹结果见图1, X光胶片上的条带进行灰度扫描分析后计算出的实验样品与对照样品灰度扫描结果的比值见图2。

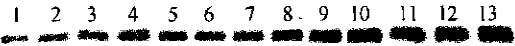


图1 NRK暴露于微囊藻毒素LR后Bax蛋白印迹结果。其中从左至右1为对照, 2、3和4分别为10、100和1000nmol/L LR暴露1h, 5、6和7分别为10、100和1000nmol/L LR暴露2h, 8、9和10分别为10、100和1000nmol/L LR暴露4h, 11、12和13分别为10、100和1000nmol/L LR暴露8h

Fig.1 Western blot of Bax induction after NRK exposed to microcystin LR Lane 1 is control Lane 2, 3, 4 are 10, 100, 1000nmol/L LR exposure with 1 hours respectively Lane 5, 6, 7 are 10, 100, 1000nmol/L LR exposure with 2 hours respectively Lane 8, 9, 10 are 10, 100, 1000nmol/L LR exposure with 4 hour respectively Lane 11, 12, 13 are 10, 100, 1000nmol/L LR exposure with 8 hours respectively

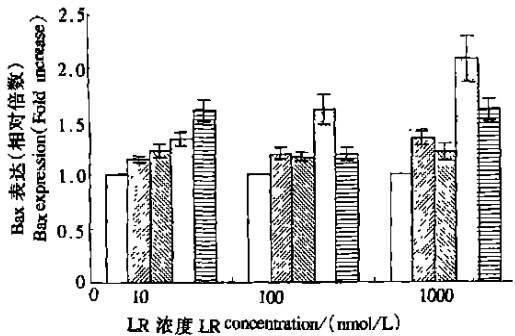


图2 NRK暴露于不同浓度微囊藻毒素LR后Bax蛋白的表达
Fig.2 Bax expression after NRK exposed to microcystin LR with different concentration

□对照 ▨1h ▩2h □4h ▨8h

图2结果的t检验统计分析表明, 各实验组与对照组之间差异都是显著的($P < 0.05$), 可以看出, LR暴露时各实验组Bax的表达均有升高, 10nmol/L LR暴露时, 随着暴露时间的增加Bax的表达也逐渐升高, 而100nmol/L和1000nmol/L

LR暴露的结果显示在暴露4h时Bax表达最高, 在8h时反而有所下降。

Bax是Bcl-2家族重要的成员, 而Bcl-2家族是一组调节细胞凋亡的主要蛋白, 主要包括抑制凋亡的Bcl-2亚族和促进凋亡的Bax和BH3原凋亡亚族, 其可能作用机制是直接参与线粒体膜上离子通道的形成或与其他和细胞凋亡相关的蛋白质相互作用而影响凋亡^[3]。Bax是一个可溶性蛋白分子, 主要位于细胞浆中, 但当凋亡发生时, 它从胞浆移到线粒体并与线粒体膜相结合^[4]。目前认为Bax通过与Bcl-2形成异源二聚体来拮抗Bcl-2的保护效应而使细胞趋于凋亡。实验证明, 位于线粒体的Bcl-2确能与Bax相互作用, 而后者也必须在线粒体上发挥其诱导凋亡的作用^[4]。

在前面的研究中, 通过PI/Annexin V双染色法可以检测到LR诱导的大鼠肾细胞NRK凋亡, 并呈现良好的剂量反应关系^[5], 同时也采用特异性的抑制剂DEVD-FMK来检测Caspase-3的活性, 结果表明LR可以激活Caspase-3, 预示在LR诱导的细胞凋亡过程中有Caspase-3参与。Caspase-3是细胞凋亡最终的执行者, 而在许多信号通路中Bcl-2家族蛋白对Caspase-3的活性都起着重要的调控作用。结合本实验结果, 可以推测在LR诱导NRK细胞凋亡的过程中, Bax蛋白通过诱导表达影响其与Bcl-2蛋白之间的平衡, 通过信号传导, 最终激活Caspase-3, 引起细胞凋亡。但LR作为一种公认的蛋白磷酸酶1和2A的强抑制剂, 也可能通过调节蛋白质的磷酸化水平而影响Bcl-2家族与线粒体之间的相互作用, 并进一步调节Caspase的活性, 这需要进一步的实验加以证实。

大鼠肾细胞暴露于不同浓度的微囊藻毒素LR时, 在不同的暴露时间内, Bax蛋白的表达都有升高, 这对于阐明微囊藻毒素的致毒作用机理将会有很重要的意义。

参考文献:

[1] Zhang Z Y, Yu X Z, Wei G R, *et al.* Study On the whole and cells level distribution of Microcystin LR in mice[J]. *J. Health Toxicology*, 2002, 16(1):5-8[张占英, 俞顺章, 卫国荣, 等, 微囊藻毒素LR在动物体内整体水平及细胞水平的分布. 卫生毒理学杂志, 2002, 16(1):5-8]

[2] Sambrook J, Fritsch E E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed[M]. Beijing: Science press, 1992

[3] Reed J C, Jurgensmeier J M, Matsuyama S Bcl-2 family proteins and mitochondria[J]. *Biochem. Biophys. Acta*, 1998, 1366: 127-137

[4] Wolter K G, Hsu Y T, Smith C L, *et al.* Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis [J]. *J. Cell Biol.*, 1997, 139(5): 1281-1292

[5] Fu W Y, Li M W, Chen J P *et al.* Detecetion of apoptosis of renal cells of mice induced by microcystin LR[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2004, 28(1): 101-102.[傅文宇, 李敏伟, 陈加平等, 用流式细胞仪PI/AnnexinV双染色法检测微囊藻毒素LR诱导的大鼠肾细胞凋亡. 水生生物学报 2004, 28(1): 101-102]